

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-493

⑬ Int. CL⁵C 12 P 21/08
A 51 K 39/395
C 12 N 5/16

識別記号

序内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)1月5日

R 6712-4B
8829-4C

8515-4B C 12 N 5/00

B

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全7頁)

⑬ 発明の名称 精製された IgM

⑭ 特許 昭63-197281

⑭ 出願 昭63(1988)8月9日

優先権主張 ⑬1987年8月10日@米国(US)⑭083136

⑬ 発明者 ジョージ・ダブ アメリカ合衆国カリフォルニア州94547 ハーキュレス・ゴールデンロッド 154

⑬ 発明者 ゴータム・ミトラ アメリカ合衆国カリフォルニア州94707 ケンジントン・カウバー-アベニュー 40

⑭ 出願人 マイルス・インコーポレーテッド アメリカ合衆国カリフォルニア州94701バークレイ・フォースアンドバーカーストリーツ・ビーオーボックス 1986

⑭ 代理人 弁理士 小田島 平吉

明細書

1) 発明の名称

精製された IgM

2) 特許請求の範囲

1) 実質的に純粋な且つ安定化された IgM 抗体調製物。

2) 治療用として適当な IgM 抗体を含む実質的に純粋な且つ安定化されたモノクローナル抗体調製物。

3) 治療用として適当であり、実質的に純粋な且つ安定化されたモノクローナル抗体調製剤であって、該調製剤が IgM 型の プseudomonas aeruginosa 抗体から成る調製物。

4) 約 80% 重量 % 以上の純度を有し、核酸の含有量が IgM 1 mg 当たり約 200 pg 以下である IgM 型のモノクローナル抗体から成る高度に純粋なモノクローナル抗体調製物。

3) 発明の詳説的な説明

4) 発明の技術的背景

本発明の開発分野: 本発明は一般的に高度に精製された免疫グロブリンに關し、特に事實上破壊を含まない IgM クラスの高度に精製された免疫グロブリンに關している。

技術背景: IgM は人間に見出だされる約 7% の免疫グロブリンを含む周知の IgM 免疫グロブリンである。 IgM 抗体は少なくとも 5 の抗体鎖を有するといわれており、免疫応答反応において最も早期に発生する抗体である。 IgM 抗体は特に細菌の感染を防除する点で優れて有効な傾向があるが、生体内では約 5 日間という比較的短い半減期を有している。更に IgM 抗体は不安定であり、安定化することが比較的困難で、純粋の形態においては特に困難である。

血漿から精製された IgM、及びごく最近はモノクローナル IgM について、各種の精製方法が示唆されている。血漿から精製された IgM の場合は、コーン(Cohn)分画Ⅲとして知られるものから比較的純度の高い IgM を得るために、アルゴール分画技術を使用できることが 1940 年代から

知られていた。例えば W. ステファン (Stephan) による特許 (N) 技手に適した濃縮 IgM を製造するためのベータープロブリオラクトン (β-propiolactone) の使用に関する米国特許第 4,318,912 号 (及び引用文献) を参照されたい。更にミウラ (Miura) 等のヨーロッパ特許出願 EP 0030,038,667 号 (IgM のアシル化) を参照されたい。又一般にアルカリ性 pH でイオン交換樹脂を用いる免疫血清グロブリンの精製に関するズッフィー (Zuffi) の米国特許第 4,272,521 号を参照されたい。他の IgM 製造又は調整技術は U. サグ (Sugge) 等、 Vox Sang. 36: 25-28 (1979); M. シタインバッハ (Sittainbach) 等、 *Preparative Biochemistry*, 3 (4), 363-373 (1973) 及び A. ウィッチャマン (Wichmann) 等、 *Biochem. Biophys. Acta*, 480: 363-369 (1977) により開示されている。IgM 型の特殊なモノクローナル抗体を製造する技術はワンズ (Wands) 等による米国特許第 4,271,145 号に示されている。高アフィニ

モノクローナル抗体は現在体細胞ハイブリッド (somatic cell hybrid) を用いて (例えば H. コプロウスキー (Koprowski) 等の米国特許第 4,172,124 号参照)、EBV 等転換癌細胞を用いて [M. ロストローム (Løistroem) の米国特許第 4,466,465 号参照]、二種の方法の組み合わせにより又は細胞の電気融合により日常的に製造されている。IgG 及び IgM クラスの両者のモノクローナルは製造され、精製され且つ特性分析が行なわれている。かような IgM 製剤は D. ナウ (Nau)、 *Biochroasigraphy*, 1, No. 1, 83-84 頁 (組織培養からの純度 95% の IgM); M. フィシナー (Fischner)、米国特許第 4,604,235 号 (マウスの腹水 [ascitic fluid] からの純度 90% の IgM であり、事實上純粋な抗体と特性決定された); J. R. ワンズ (Wands) 等、 *国際特許出願公開 82/01072* (診療用の高アフィニティ IgM モノクローナル抗体であり、上記に引用された); S. バーチール (Burchiel) 等、 J. Immunol. Meth. 69, 3-31 (1984 年) (カ

ニティ IgM 抗体を用いる特殊な免疫測定法は、ワンズ等の名前で発表された国際特許出願公開 82/01072 に記載されている。又 I. A. サンプソン (Sampson) 等、 *J. Immunol. Meth.* 69, 9-15 (1984) が参照されたい。各種の技術的理由から、血漿から由来した IgM は精製することが比較的困難であり、今まで知られている最高の純度は IgM として約 90% 純度である。又こうした血漿から由来した IgM の核酸含量は、IgM がヒトの血漿を原料として精製されているので、一般に重大な問題ではなかった。

血漿から由来した IgM の一般的な核酸含量は 1 μg 当たり約 1 ng ないし 10 μg の範囲にあると言われている。

ケーテー (Köhler) 及びミルスティン (Milstein) による "Continuous Culture of Fused Cells Secreting Antibody of Predetermined Specificity", *Nature*, 256: 495-497 (1975) の発表以来、モノクローナル抗体の製造は周知となった。所与の特異性のセ

スの腹水から精製された IgG; J. デシャンブ (Deschamps) 等、 *Anal. Biochem.* 147, 451 頁、 1985 年 (マウスの腹水からの IgG); 及び T. ブルックス (Brooks) 等、 *Anal. Lab.* 10 月号、 1985 年 (マウス及びヒトの IgG 及び IgM の精製のためのヒドロキシアパタイトの利用) により記載されている。モノクローナルを原料にして得られた IgM を精製するため多くの努力が払われたが、今日までの IgM の最高の純度は約 5% である (上記のナウの報告を参照)。

P. アエルギノーザ (*P. aeruginosa*) に対するモノクローナル IgM の製造は開示されており、 IgM はヒトのリンバ芽球様 (lymphoblastoid) 細胞培養から産導され、及び D. E. A. E. セアフィセル (Sephadex) が IgM の最初の精製に使用された。0.005 ないし 0.5 μg / ml の濃度を持った IgM の治療上許容できる等濃度前波は既知であるが、 IgM 製品の相対的純度又はその點については何もデータが与えられていない。

血漿から由来した IgM の核酸含量は重要な問

心を用いていないが、モノクローナル IgM の抗原含量は、異質(ヒト以外)の被膜が非経口的に投与された製品を通じて人間に導入される危険の可能性があるために、強めて重要である。従って精製され且つ濃縮された IgM 製品を得ることが望ましいことに加えて、全く又は殆んど核酸を含まないような製品を得ることも要望されるところである。本発明者等は加工工程及び貯蔵条件を注意深く増強することにより、かような製品が製造可能で、且つ安定化することができることを新しく見出だした。本発明者等の高度に精製された IgM の詳細は下記に記載される。

本発明の要約

本発明の示すは IgG 重量% 以上の純度及び IgM 1 g 当たり約 200 pg 以下の抗原含量を有する IgM 抗体から成る、実質的に純粋で安定化された IgM 抗体生液物に関する。好適な具体化においては、IgM の純度は IgG 重量% よりも大で、抗原含量 IgM 1 g 当たり約 4 pg 程度が又はそれより低く、且つ製剤は安定剤として NaCl 1

実質化された IgM[”]という表現は、約 IgG 重量% 以上の純度を有する IgM 抗体及び抗原含量が IgM 1 g 当たり約 200 pg 以下である IgM 製剤を指す。“安定化された IgM 製剤”とは、少なくとも 6 ヶ月の期間にわたってサイズ・エクスクルージョン・クロマトグラフィーによって測定された分子量分布における変化が ± 0% 以内(± 又は-) (例えばファルマシア [Pharmacia] FPL C-スベロース® B のピーク面積)である製剤を意味する。IgM 抗体は生物学的に固有(免疫結合体を形成する能力がある)であり、NaCl、アルブミン又はアミノ酸のような適当な安定化剤の存在において、約 IgG 1 g の範囲の pH に保つことにより安定化される。抗原含量の低いことは、被膜質の加熱によらず、IgM 製剤の近似的な均一性を得るために望ましいが、異質原(動物起源又は人間の細胞であっても、例えば E B V 形質転換によって遺伝的に変質したもの)からの被膜が存在しないか又は殆んど存在しないことを保証することが重要であるので、培養液(例えばハイブ

及びアルブミンの存在において、約 IgG 1 g の範囲の pH、温度には pH 約 8 に保つことにより安定化される。上記の特性を有する代表的な製剤は ソイドモナス・アエルギノーザ (P. aeruginosa) 細胞の表面に見出だされる血清凝集菌因子に特異的な一種又は多種の IgM 抗体を含んでいる。製剤は一種又は多種のクローリンから得られる IgM 抗体を含んでおり、P. aeruginosa の感染を治療するのに有用であることが見出されていることを裏付けている。製剤はモノクローナル抗体を培養し、次いで収穫された抗体をイオン交換樹脂及びサイズ・エクスクルージョン・(size exclusion)クロマトグラフィー…が含まれる柱窓膜で調節された…液の処理工程により処理することにより得ることができる。

特定な説明

本示すの非常に重要な懸念は、本発明の IgM 製剤の全体的な純度、安定性及び抗原の低含量である。本文で用いられるような“実質的に純粋で

リドーマ又は胎質細胞の)から得られる如何なる IgM 生液物においても本質的に望ましいことである。

下記の実験例は或種の血清型の ソイドモナス・アエルギノーザ 細胞に特異的な事実上純度を有する安定化された IgM を示している。本発明者等が精製し安定化することができた IgM 抗体は下記の A. T. C. C. クローリンから生成したものである: 系統 G F 1, アイッシャー・タイプ (R is her Type) 2, A. T. C. C. アクセシジョン (Accession) No. CRL 8562, ライン 5 G 2, フィッシャー・タイプ B, A. T. C. C. アクセシジョン No. CRL 8797, 及びライン 13 C 1, フィッシャー・タイプ 5, A. T. C. C. アクセシジョン No. CRL 8796。

材料及び方法

下記の実験例はグラス M 及び各種のフィッシャー・タイプのモノクローナル抗体が組織培養液から高度に精製されることを示す。

実験例

ライン SFL 11、A. T. C. C. アクセシヨン No. CRL 8552 の細胞はフィッシャー・タイプ 2 のブサイドモナス・アエルギノーザに特異的なクラス M のモノクローナル抗体を生産するヒトのリンパ芽球細胞である。このラインはヒトの血漿アルブミン、インシクリン及びトランスクルリンを濃縮したハナ・バイオロジクス(Hana Biologics)複合培養基の混合物中で生育させた。培養槽は複合式タンクであった。

上記の培養液から得られた 5.0 mg / 1.0 gM の容積 4.0 L を、0.2 μm フィルター(ミクロゲン [Microgen])を通過した。沪液は 1.0 0.000 の分子量を遮断するタングエンシカル・フロー・ノンプラン (tangential flow membrane : リコポア [Millipore])を用いて 1.0 L に濃縮した。濃縮物を 5.0 °C に冷却し、pH 7.4 に調整した。1.00 g の PEG を添加し、1 時間搅拌した。溶液を 1.0, 0.000 × g で 30 分間遠心分離した。上澄液を捨て、沈殿を -35 °C で凍結した。

沈殿を 1.0 g の緩衝液(0.05 M トリス、0.

0.05 M トリス、0.01 M グリシン、pH 8.0)と透析液(透析袋(diafilter))した。溶液を透析沪液した。一部を凍結させ、8.0 時間サイクル(-4.0 °C で 1.0 時間、-2.0 °C で 2.0 時間、-0.0 °C で 2.0 時間、2.0 °C で 1.0 時間及び 3.7 °C で 2.0 時間)で透析乾燥した。

累積収率は 3.0 - 3.5 % である。液は 5.0 °C で 1 年以上沈殿を起こすことなく透明のままであった。凍結乾燥した生成物は白色で、水で 3 分間以内に再構成される。SDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動(PAGE)法及びファルマシア FPLC -セファロース G によれば、純度は 9.8 % よりも大である。ハイブリダイゼーション・プローブ試験法による核酸含量は 6.7 ピコグラム / mg 1.0 gM 以下である。

実験例 2

ライン SG 2、A. T. C. C. アクセシヨン No. CRL 8797 の細胞はフィッシャー・タイプ 6 のブサイドモナス・アエルギノーザに特異的なクラス M のモノクローナル抗体を生産するヒ

0.8 M NaCl、pH 8.0)中に再分散させた。pH を 4.5 に低下させた。溶液を 1.0, 0.000 × g で 30 分間遠心分離し、沈殿を凍結した。上澄液の pH を再度 8.0 に調整した。溶液を緩衝液(0.05 M トリス、0.008 M NaCl、2% トウイーン[Tween]、pH 8.0)と平衡させた 1.0 g の DEAE-セファロース ファースト・フロー(Fast Flow)(ファルマシア)の陰イオン交換カラムに吸着させた。1.0 M を緩衝液(0.05 M トリス、1.0 M NaCl、pH 8.0)で直線的勾配により平衡させた。溶液を 1.00, 0.000 分子量以上で濃縮し 0.5 L とした。濃縮物を緩衝液(1.0 M NaCl、0.05 M トリス、0.01 M グリシン、pH 8.0)と平衡させたセファロース CL-6B のサイズ・エクスクルージョン・カラム(ファルマシア)上で分別した。1.0 gM 濃縮液は 6.0 L であった。

0.5 g のヒト血漿アルブミンを添加し、1.0, 0.000 分子量濃度を用いて液量を 0.1 L に濃縮した。溶液を 0.5 L の緩衝液(0.15 M NaCl、

トのリンパ芽球細胞である。このラインは実験例 1 のラインと事实上同一の技法により生成させた。

最初の 0.2 μm 沪液を pH 4.0 に調整し、2 時間保持する以外は、培養液を実験例 1 のラインと同様な技法により最終生成物まで培養した。上記操作後、溶液の pH を中性に再調整し、各工程を更に経験した(例えば濃縮等)。しかし、培養液の容積は 8.0 mg / L で 1.0 L であり、他の容積もこれに比例して定めた。最終配合物の緩衝液は 0.15 M NaCl、0.01 M グリシン、pH 8.0 であった。

累積収率は 3.0 - 3.5 % である。液は 5.0 °C で 6 ヶ月以上沈殿を起こすことなく透明のままであった。凍結乾燥した生成物は白色で、水で 3 分間以内に再構成される。SDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動(PAGE)法及びファルマシア FPLC -セファロース G によれば、純度は 9.8 % よりも大である。ハイブリダイゼーション・プローブ試験法による核酸含量は 8.5 ピコグラム / mg 1.0 gM 以下である。

実施例 3

ライン | 3 C |, A. T. C. C. No. 87

Uの細胞はフィッシャー・タイプ5のブソイドネクス・エルギノーゼに特異的なクラスMのモノクローナル抗体を生産するヒトのリンパ芽球細胞である。このラインは実施例1のラインと事実上同一の技術により成長させた。

培養液を実施例1のラインと事実上同一の技術により最終生成物まで精製した。しかし、培養液の容積は100 μ g / Lで10 Lであり、他の容積もこれに比例して定めた。最終配合物の濃度は0.15M NaCl, 0.01M グリシン、pH 8.0であった。

累積収率は30-35%である。液は50で6ヶ月以上沈殿を起こすことなく透明のままであった。凍結乾燥した生成物は白色で、水で3分間以内に再構成される。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法及びファルマシアFPLC-セファロース上によれば、純度は98%よりも大である。ハイブリダイゼーション・プローブ試験法による

1. 実質的に純粋な且つ安定化されたIgM抗体製剤。

2. 約98質量%以上の純度を有するヒトIgM抗体から成る上記1に記載の製剤。

3. 核酸の量がIgM 1 μ g 当たり約200 pg以下である上記2に記載の製剤。

4. 核酸の量がIgM 1 μ g 当たり約10 pg以下である上記3に記載の製剤。

5. 核酸の量がIgM 1 μ g 当たり約4 pg以下である上記3に記載の製剤。

6. 治療用に適した上記1に記載の製剤。

7. 溶出性試験剤を含む上記6に記載の製剤。

8. 安定化液の塩及び蛋白質を含む上記7に記載の製剤。

9. 約4ないし約10の範囲のpHを有する上記8に記載の製剤。

10. 約7ないし約9の範囲のpHを有する上記9に記載の製剤。

11. 治療用として適当なIgM抗体を含む実質的に純粋な且つ安定化されたモノクローナル抗体。

核酸含量は8.5ピコグラム/ μ g IgM以下である。

本発明者等の一般的な方法は液面界面中に略図的に示してある。

最終生成物

高純度の生成物が、好適にはNaCl、アルブミン、アミノ酸又は炭水化物の存在において、り、0.1 μ g / μ l ないし50 μ g / μ l の範囲の濃度及び4ないし10の範囲のpHに調節することにより安定化できることが見出された。最終生成物は液状(上記のような)或いは凍結乾燥され、感染性病原を不活性化するための既知の方法で処理されたものであってもよい。

上記の開示が与えられた以上、この分野の熟達者は種々な変化法があり得ることが教示されよう。從って開示された本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ制限されることを意図するものである。

本発明の主なる特徴及び実施原様は以下の通りである。

体製剤。

12. 約98質量%以上の純度の抗体を有するヒトIgM抗体から成る上記1に記載の製剤。

13. 核酸の量がIgM抗体 1 μ g 番たり約200 pg以下である上記12に記載の製剤。

14. 核酸の量がIgM抗体 1 μ g 番たり約0 pg以下である上記13に記載の製剤。

15. 核酸の量がIgM抗体 1 μ g 番たり約4 pg以下である上記13に記載の製剤。

16. 適当な試験剤を含む上記1-16に記載の製剤。

17. 安定化液のヒト由来アルブミンを含む上記1-6に記載の製剤。

18. 約4ないし約10の範囲のpHを有する水溶液の形態にある上記1-7に記載の製剤。

19. 約7ないし約9の範囲のpHを有する上記1-8に記載の製剤。

20. 抗体が病原性のグラム陰性菌生物に見出された抗原に特異的である上記1-9に記載の製剤。

2 1. 抗原として適当であり、実質的に純粋な且つ安定化されたモノクローナル抗体製剤であつて、該製剤が IgM 型の抗ゾイドモナス・エエルギノーザ抗体から成ること。

2 2. 抗酸の含量が IgM 1 mg 当たり約 2.0 pg 以下である上記 2 1 に記載の製剤。

2 3. 抗酸の含量が IgM 1 mg 当たり約 1.0 pg 以下である上記 2 2 に記載の製剤。

2 4. 抗酸の含量が IgM 抗体 1 mg 当たり約 4.0 pg 以下である上記 2 3 に記載の製剤。

2 5. 少なくとも二種のフィッシャー血清型抗体に特異的である抗体から成る上記 2 4 に記載の製剤。

2 6. フィッシャー血清型抗体に特異的である抗体から成る上記 2 5 に記載の製剤。

2 7. 安定化度のヒト血清アルブミンを含む上記 2 6 に記載の製剤。

2 8. 約 4 ないし約 1.0 の範囲の pH を有する水溶液の形態にある上記 2 7 に記載の製剤。

2 9. 約 7 ないし約 9 の範囲の pH を有する上

製。

3 0. フィッシャー血清型抗体に特異的である抗体がある上記 3 7 に記載の製剤。

3 1. 安定化度のヒト血清アルブミンを含む上記 3 8 に記載の製剤。

3 2. 安定化度の炭水化物を含む上記 3 8 に記載の製剤。

3 3. 約 4 ないし約 1.0 の範囲の pH を有する水溶液の形態にある上記 3 8 に記載の製剤。

3 4. 約 7 ないし約 9 の範囲の pH を有する上記 4 1 に記載の製剤。

3 5. 炭水化物がデキストロース、スクロース及びマルトースから選択される上記 3 8 に記載の製剤。

3 6. 約 4 ないし約 1.0 の範囲の pH 、約 0.5 ないし 5 重量 % のヒト血清アルブミン、約 0.1 ないし 0.4 % のマルトース、約 0.0 ないし 0.5 M の NaCl 及び約 0.1 ないし 0.0 1 M のグリシンを有する水溶液の形態にある上記 3 8 に記載の製剤。

3 7. 下記の如き: 5 mg / 50.0 IgM; 5 mg

記 2 8 に記載の製剤。

3 8. IgM を安定化するのに充分な量の炭水化物を含む上記 2 8 に記載の製剤。

3 9. 約 9.8 重量 % 以上の純度を有し、抗酸の含量が IgM 1 mg 当たり約 2.0 0 pg 以下である IgM 型のモノクローナル抗体から成る高純度に純粋なモノクローナル抗体製剤。

3 10. 抗酸の含量が IgM 1 mg 当たり約 1.0 pg 以下である上記 3 9 に記載の製剤。

3 11. 抗酸の含量が IgM 抗体 1 mg 当たり約 4.0 pg 以下である上記 3 10 に記載の製剤。

3 12. 約 9.9 重量 % よりも大きい IgM 純度を有する上記 3 10 に記載の製剤。

3 13. 抗体が病原性のグラム陰性微生物の抗原に特異的である上記 3 11 に記載の製剤。

3 14. 抗体が IgM 型の抗ゾイドモナス・エエルギノーザ細菌の抗原に特異的である上記 3 12 に記載の製剤。

3 15. 少なくとも二種のフィッシャー血清型抗体に特異的である抗体がある上記 3 13 に記載の製

剤。

／ 28 のアルブミン: 0.1 5 M の NaCl; 0.0 1 M のグリシン; を有し、且つ pH 約 8.0 の水溶液の形態にある上記 4 4 に記載の製剤。

4 図面の簡単な説明

図面は本請求の…具体化例を説明するために使用される一般的な工事を示すフローチャートである。全体の工程の内の個々の段階から得られる段階的な純度の増加及び抗酸含量の減少も又示されている。

特許出願人 マイルス・インコーポレーテッド
代 理 人 伊達士 小田島 幸吉

